

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation<sup>4</sup> : C12N 9/00, 1/38, 1/00 C12N 5/00</p>		A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 89/06687 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. Juli 1989 (27.07.89)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP89/00015 (22) Internationales Anmeldedatum: 11. Januar 1989 (11.01.89) (31) Prioritätsaktenzeichen: P 38 01 023.2 (32) Prioritätsdatum: 13. Januar 1988 (13.01.88) (33) Prioritätsland: DE</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), BG, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK, FI, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), NO, RO, SE (europäisches Patent), SU.</p>	
		<p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</p>	
<p>(71) Anmelder: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstr. 170-178, Postfach 65 03 11, D-1000 Berlin 65 (DE).</p>		<p>(72) Erfinder: FIEDLER, Franz ; Pasinger Heuweg 102, D-8000 München 50 (DE). ZENK, Meinhart, H. ; Pfeilstielstraße 17, D-8000 München 60 (DE). GUNDLACH, Heidrun ; Stettinerweg 20, D-8046 Garching (DE). WEBER, Alfred ; Schützallee 56, D-1000 Berlin 37 (DE). KENNECKE, Mario ; Taubertstr. 31f, D-1000 Berlin 33 (DE).</p>	

(54) Title: PROCESS FOR ACTIVATING ENZYMES AND PROMOTING SYNTHESIS IN ORGANISMS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR STEIGERUNG VON ENZYM-AKTIVITÄTEN UND DER SYNTHESELEISTUNG VON ORGANISMEN

(57) Abstract

In the process disclosed, the organisms are brought into contact with inactivated elicitor-containing microorganisms, fragments of the latter, or excretions of elicitor-containing microorganisms. Only inactivated elicitor-containing bacteria, fragments of the latter, or excretions of elicitor-containing bacteria may be used to activate enzymes and promote synthesis in non-microbial organisms. The process can be used, for example, to promote synthesis in microorganisms or plants which produce pigments, antibiotics, alkaloids or phytoalexins or to activate enzymes in microorganisms capable of transforming steroids.

(57) Zusammenfassung

Ein Verfahren zur Steigerung von Enzym-Aktivitäten und der Syntheseleistung von Organismen wird beschrieben, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man dieselben mit inaktivierten Elicitoren-haltigen Mikroorganismen, Fragmenten derselben oder Exkretionen Elicitoren-haltiger Mikroorganismen in Kontakt bringt, mit der Maßgabe, daß man zur Steigerung von Enzym-Aktivitäten und der Syntheseleistung nicht-mikrobieller Organismen inaktivierte Elicitoren-haltige Bakterien, Fragmente derselben oder Exkretionen Elicitoren-haltiger Bakterien verwendet. Das erfundungsgemäße Verfahren ermöglicht es, beispielsweise die Syntheseleistung von Farbstoffen, Antibiotika, Alkaloiden oder Phytoalexine bildenden Mikroorganismen oder Pflanzen zu steigern oder die Enzymaktivitäten von zur Steroidtransformation befähigten Mikroorganismen zu erhöhen.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabun	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	HU	Ungarn	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	IT	Italien	RO	Rumänien
BJ	Benin	JP	Japan	SD	Sudan
BR	Brasilien	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	TG	Togo
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
FI	Finnland	ML	Mali		

Verfahren zur Steigerung von Enzym-Aktivitäten und  
der Syntheseleistung von Organismen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Steigerung von Enzym-Aktivitäten und der Syntheseleistung von Organismen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man dieselben mit inaktivierten Elicitoren-haltigen Mikroorganismen, Fragmenten derselben oder Exkretionen Elicitoren-haltiger Mikroorganismen in Kontakt bringt, mit der Maßgabe, daß man zur Steigerung von Enzym-Aktivitäten und der Syntheseleistung nicht-mikrobieller Organismen inaktivierte Elicitoren-haltige Bakterien, Fragmente derselben oder Exkretionen Elicitoren-haltiger Bakterien verwendet.

Elicitoren sind bekanntlich mikrobielle oder pflanzliche Wirkstoffe, die mit Geweben höherer Pflanzen in Kontakt gebracht, deren Enzym-Aktivitäten und Syntheseleistung steigern. Die so in diesen Pflanzen akkumulierten Inhaltsstoffe werden, wenn sie antimikrobiell sind als Phytoalexine bezeichnet (Naturwissenschaften 68, 1981, 447ff, Adv. Enzymol. 55, 1983, 1ff und Spektrum der Wissenschaft 11, 1985, 85ff).

Gegenwärtig sind mehr als 100 Verbindungen, die der Phytoalexindefinition genügen, aus verschiedenen Pflanzenarten isoliert worden. Sie gehören verschiedenen Naturstoffgruppen an wie Terpenoiden, Linolensäurederivaten, Acetylenen und Polyacetylenen, Bibenzylen, Stilbenen, Phenanthrenen und Dihydrophenanthrenen, Benzofuranen und Phenolbenzofuranen, Furocumarinen, Avenaluminen, Flavanen, Phenylbenzofuranen, Benzoxazinonen, Alkaloiden, Isoflavonoiden (Brooks and Watson, Nat. Prod. Reports 2, 1985, 427).

Eine technische Anwendung hat diese Elicitoren-Wirkung bislang nicht gefunden. Dies hat mehrere Gründe: Es ist von wenigen Ausnahmen abgesehen bislang nicht möglich, Zellen höherer Pflanzen unter wirtschaftlich vertretbaren Bedingungen in Submerskulturen zu vermehren. Elicitoren in der Fermentation mittels Mikroorganismen anzuwenden, schien a priori zwecklos zu sein, da man nach der vorherrschenden Lehrmeinung über die Wirkungsweise von Elicitoren (Albersheim P. und Darvill A. G. Spektrum der Wissenschaft, 11, 1985, 85) davon ausgehen mußte, daß diese die Enzymaktivität und die Stoffwechselvorgänge in Mikroorganismen nicht beeinflussen.

Bemerkenswert ist auch, daß nach geltender Lehrmeinung Bakterien eine Phytoalexinbildung bei Pflanzen nur auslösen können, indem sie, wie zum Beispiel Vertreter der Gattung *Erwinia*, mittels bestimmter Enzyme (Pektinasen) aus der pflanzlichen Zellwand Elicitoren (Oligogalakturonide) freisetzen, die als endogene Elicitoren die Phytoalexinbildung stimulieren.

Es wurde nun gefunden, daß Verbindungen und Zellpräparationen von Mikroorganismen, die im folgenden als Elicitoren bezeichnet werden, überraschenderweise doch in der Lage sind, in Mikroorganismen Enzymaktivitäten und deren Syntheseleistung zu steigern. Darüberhinaus wurde gefunden, daß es auch Bakterien gibt, die Elicitoren enthalten, welche keine Enzyme oder nutritive Faktoren sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann grundsätzlich mittels isolierten oder synthetisierten Elicitoren durchgeführt werden, dies ist aber in der Regel viel zu aufwendig. Es genügt, wenn man inaktivierte Elicitoren-haltige Mikroorganismen verwendet, oder Fragmente dieser Mikroorganismen, wie zum Beispiel Zellwandfraktionen, Zellfragmente mechanisch aufgeschlossener oder chemisch bzw. enzymatisch lysierter Zellen oder durch Hilfsstoffe, wie zum Beispiel Ethanol oder Aceton präzipitierte Zellinhaltsstoffe. Inaktivierte Mikroorganismen sind im Sinne der Erfindung solche, die auf Dauer ihre Lebensfähigkeit verloren haben.

Wenn der Mikroorganismus Elicitoren in die Kulturbrühe abgibt, oder nach Lysis oder Sterilisation wasserlösliche Elicitoren-haltige Zellinhaltsstoffe bildet, so kann man auch diese Elicitoren-haltigen Exkretionen der Mikroorganismen zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens verwenden. Jede Form Elicitoren-haltigen Produkts von Mikroorganismen eignet sich zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.

Mikroorganismen, von denen bekannt ist, daß sie Elicitoren besitzen sind unter anderem die in der nachfolgenden Tabelle 1 aufgelisteten Pilzstämme und Hefen:

T a b e l l e 1

<i>Alternaria carthami</i>	Arch. Bioch. Biop. <u>229</u> , 1984, 136
<i>Botrytis cinerea</i> (ATCC 48345)	Physiol. Plant Pathol. <u>11</u> , 1977, 287
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Phytochemistry <u>23</u> , 1984, 759
<i>Ceratocystis ulmi</i>	Phytochemistry <u>23</u> , 1984, 383
<i>Chondrostereum purpureum</i>	J. Chem. Soc. Perkin Trans I, 1984, 14341
<i>Cladosporium fulvum</i> (ATCC 44961)	Physiol. Plant Pathol. <u>16</u> , 1980, 391
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (ATCC 52471)	Eur. J. Biochem. <u>129</u> , 1983, 593
<i>Fusarium solani</i>	Plant Physiol. <u>76</u> , 1984, 833
<i>Fusarium solanifspmori</i> (ATCC 44934)	Nat. Prod. Rep. <u>2</u> , 1985, 439
<i>Ganoderma applanatum</i>	Phytochemistry <u>22</u> , 1983, 1039
<i>Glomerella cingulata</i>	Physiol. Plant Pathol. <u>21</u> , 1982, 171
<i>Helminthosporium carbonum</i> (ATCC 52471)	Z. Naturforsch. Sect. C <u>38</u> , 1983, 899
<i>Monilinia fructicola</i>	J. Am. Chem. Soc. <u>84</u> , 1962, 1919
<i>Nectria haematococca</i>	Phytochemistry <u>22</u> , 1983, 2291
<i>Phoma exigua</i>	Phytochem. <u>21</u> , 1982, 1818
<i>Phytophthora cannabivora</i>	Z. Naturf. Sect. C <u>39</u> , 1984, 217
<i>Phytophthora capsici</i> (ATCC 52771)	Physiol. Plant Pathol. <u>18</u> , 1981, 379
<i>Phytophthora infectans</i> (ATCC 44776)	Phytochem. <u>23</u> , 1984, 537
<i>Phytophthora megasperma</i> var <i>glycinea</i>	Arch. Bioch. Biop. <u>229</u> , 1984, 136
<i>Phytophthora infectans</i>	Phytopathol. Z. <u>27</u> , 1956, 237
<i>Phytophthora megasperma</i>	J. Biol. Chem. <u>259</u> , 1984, 11341
<i>Phytophthora nicotiane</i>	Phytopathology <u>71</u> , 1981, 864
<i>Puccinia coronata</i>	Physiol. Plant Pathol. <u>20</u> , 1982, 189
<i>Pyricularia oryzae</i> (ATCC 15923)	Agric. Biol. Chem. <u>48</u> , 1984, 253
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Plant Physiol. <u>62</u> , 1978, 107
<i>Verticillium albo-atrum</i>	Nat. Prod. Rep. <u>2</u> , 1985, 429
<i>Verticillium dahliae</i> (ATCC 26289)	ATCC-Katalog, 16. Aufl. 1984

In eigenen Versuchen wurden proteolytisch mittels Trypsin gereinigte Zellwandpräparate von Gram-positiven Bakterienstämmen der Gattungen *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Lactobacillus*, *Pimelobacter*, *Rhodococcus* und *Staphylococcus* und in Wasser hitzesterilisierte Mikroorganismen dieser Gattungen und deren Filtrate daraufhin untersucht, ob sie Elicitoren besitzen. In der nachfolgenden Tabelle 2 sind die Bakterienstämme aufgeführt, in denen Elicitoren nachgewiesen werden konnten.

Tabelle 2

*Bacillus licheniformis* ATCC 9945  
*Bacillus pumilus* ATCC 7061  
*Brevibacterium butanicum* ATCC 21196  
*Brevibacterium flavum* ATCC 13826, ATCC 14067  
*Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13655  
*Brevibacterium glutamingenes* ATCC 13747  
*Brevibacterium ammoniagenes* ATCC 6872  
*Corynebacterium hydrocarboplastum* ATCC 15592  
*Corynebacterium nephridii* ATCC 11425  
*Corynebacterium paurometabolum* ATCC 8368  
*Corynebacterium lilium* ATCC 15990  
*Corynebacterium striatum* ATCC 6940  
*Corynebacterium xerosis* ATCC 373  
*Corynebacterium diphtheriae* (Stamm Mass. 8/Behring Werke)  
*Corynebacterium melassecola* ATCC 17965  
*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032  
*Corynebacterium uratoxidans* ATCC 21749  
*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ATCC 7469  
*Lactobacillus plantarum* DSM 20174  
*Pimelobacter tumescens* AJ 1460  
*Rhodococcus fascians* ATCC 12975  
*Rhodococcus fascians* 1 - Isolat von Prof. Dr. Stolp, Univ. Bayreuth  
*Rhodococcus fascians* 2 - Isolat von Prof. Dr. Stolp, Univ. Bayreuth

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden bislang nur Bakterienstämme weniger Gattungen von Gram-positiven Eubakterien daraufhin untersucht, ob sie Elicitoren besitzen. Auch unter den Pilzstämmen inklusive der Hefen wurden - soweit man den Vorpublikationen entnehmen kann - meist nur solche auf das Vorhandensein von Elicitor-Aktivitäten untersucht, von denen bekannt ist, daß sie phytopathogen sind. Es ist deshalb zu erwarten, daß zusätzlich noch zahlreiche Mikroorganismen, wie zum Beispiel Bakterien der Gattungen *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Nocardoides* oder *Pseudonocardia* aufgefunden werden können, die ebenfalls Elicitoren besitzen.

Die Prüfung von Mikroorganismen auf Elicitor-Aktivität kann problemlos mittels der üblichen Screening-Versuche, wie sie dem Fachmann geläufig sind durchgeführt werden.

So kann man beispielsweise in Reihenversuchen die Mikroorganismen, deren Enzymaktivität oder Syntheseleistung gesteigert werden soll, in Submerskulturen anzüchten, den einzelnen Kulturen inaktivierte Mikroorganismen unterschiedlicher Spezies oder Subspezies zusetzen und nach erfolgter Fermentation analytisch ermitteln in welchen Kulturen eine Steigerung von Enzymaktivitäten oder der Syntheseleistung erzielt wird. Eine Steigerung von Enzymaktivitäten der Mikroorganismen erkennt man beispielsweise daran, daß man bei der fermentativen Umwandlung von Substraten eine erhöhte Bildungsgeschwindigkeit des - oder erhöhte Ausbeute an - Verfahrensprodukt erzielt. Entsprechend kann eine gesteigerte Syntheseleistung der Mikroorganismen beispielweise an einer erhöhten Bildungsgeschwindigkeit des - oder erhöhten Ausbeute an - Inhaltsstoffen des Mikroorganismus erkannt werden.

Wie die bislang durchgeföhrten Versuche, die in den Ausführungsbeispielen näher beschrieben werden, zeigen, scheint das erfindungsgemäße Verfahren zur Steigerung von Enzym-Aktivitäten oder der Syntheseleistung von Mikroorganismen sehr vielseitig anwendbar zu sein. So konnte durch Zugabe von Zellwandpräparationen von in der Tabelle 2 aufgeführten Mikroorganismen die Farbstoffbildung

des *Streptomyces lividans* (Actinorhodin, Prodigiosin), sowie die Farbstoffbildung des *Streptomyces coelicolor*, des *Streptomyces griseoruber*, des *Streptomyces latericius*, des *Streptomyces purpurascens* und des *Streptomyces violaceus* stimuliert werden. Ferner war es möglich, die Bildung von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika des *Streptomyces clavuligerus* und die Alkaloidsynthese von *Claviceps paspali* zu stimulieren.

Eine derartige Steigerung der Syntheseleistung von Mikroorganismen wird man nicht nur mittels der Zellpräparationen von den in der Tabelle 2 aufgeführten Bakterien erzielen können, sondern es ist zu erwarten, daß auch mittels Elicitoren-haligen Pilzen und Hefen, wie sie in der Tabelle 1 aufgeführt sind, eine Steigerung von Enzymaktivitäten und der Syntheseleistung von Mikroorganismen erzielt werden kann.

Es gelang ferner mit Hilfe von Zellwandpräparationen von in der Tabelle 2 aufgeführten Mikroorganismen in Zellkulturen höherer Pflanzen, wie *Eschscholtzia californica* oder *Rauvolfia serpentina* eine signifikante Steigerung der Alkaloidbildung zu erzielen.

Weiterhin gelang es mit Hilfe dieser Zellwandpräparationen, die Fähigkeit von *Bacillus latus*, Steroide in der 1,2-Position zu dehydrieren, und die Fähigkeit von *Rhodotorula glutinis*, 17-Ketosteroide selektiv zu reduzieren, und die Fähigkeit von *Penicillium raistrickii*, Steroide in der 15 $\alpha$ -Position zu hydroxylieren, deutlich zu steigern. Erfolglos blieb bislang lediglich der Versuch, mit Hilfe dieser Zellwandpräparation die Fähigkeit von *Curvularia lunata* zur 11 $\beta$ -Hydroxylierung von Steroiden zu steigern.

Diese Versuche lassen die Hoffnung berechtigt erscheinen, daß es mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens möglich sein wird, auch die Bildung zahlreicher anderer gewerbsmäßig nutzbarer mikrobieller Inhaltsstoffe zu stimulieren und weitere Enzymaktivitäten von Mikroorganismen, die technisch nutzbar sind, zu steigern.

7

Derartige mikrobielle Inhaltsstoffe sind beispielsweise Antibiotika, wie die Penicilline, Cephalosporine, Cyclosporine, Actinomycine, Gramicidine, Neomycine, Gentamycine, Nystatine, Tetracycline, Nikomycine oder das Lincomycin, das Erythromycin, das Chloramphenicol, das Griseofulvin oder die Fusidinsäure u.a., Mutterkornalkaloide, wie das Ergocryptin, das Ergotamin, das Ergosin, das Ergocristin, das Ergocornin, das Agroclavin, das Chanoclavin, das Festuclavin, die Paspalinsäure oder die Lysergsäure-Derivate, Vitamine, wie das Vitamin B 12, das Riboflavin oder das B-Carotin, Enzyme wie die Amylasen, Glucoseisomerasen, Proteasen, Pectinasen, Cellulasen, Lipasen, Penicillinacylasen, Chitinase oder die Lactase, Nucleoside, wie die Guanylsäure oder Inosylsäure oder beispielsweise auch Aminosäuren, wie das Cystein, die Glutaminsäure, das Tryptophan, oder das Lysin.

Grundsätzlich sollte es auch möglich sein, bei genetisch veränderten Mikroorganismen, die endogene oder exogene Proteinbildung zu steigern. Solche nutzbaren Proteine sind nicht nur die bereits erwähnten Enzyme und Antibiotika, sondern auch beispielsweise Interferon, Insulin, Erythropoitin und TNF.

Mikroorganismen, die wegen ihrer Enzymaktivitäten technisch angewendet werden, sind beispielsweise in folgenden Publikationen beschrieben:

W. Charney and H. Herzog: Microbial Transformations of Steroids; Academic Press, New York etc. 1967

K. Kieslich: Microbial Transformations of Non-steroidal Cyclic Compounds; Georg Thieme Publ. Stuttgart (DE), 1976 und

K. Kieslich: Biotransformations; in H. J. Rehm und G. Reed (Herausgeber): Biotechnology; Weinheim (DE) etc. Vol 6a, 1984.

Derartige Mikroorganismen sind unter anderem solche, die Steroidtransformationen wie die  $11\alpha$ -,  $11\beta$ - oder  $15\alpha$ -Hydroxylierung, die  $\Delta^1$ -Dehydrierung,  $17\alpha$ ,  $17\beta$ -Ketoreduktionen, oder den Seitenkettenabbau von Sterinen oder Antibiotikatransformationen, wie Penicillinspaltung bewirken.

Es ist nicht unwahrscheinlich, daß es mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens gelingen könnte, neue technisch verwertbare mikrobielle Inhaltsstoffe, wie zum Beispiel neue Antibiotika aufzufinden, indem man den zu testenden Mikroorganismen inaktive Elicitoren-haltige Mikroorganismen zusetzt. Diese Hoffnung ist deshalb nicht unbegründet, weil bekannt ist, daß zahlreiche höhere Pflanzen Phytoalexine nur dann in nennenswerten Mengen bilden, wenn sie mit Elicitoren-haltigen Mikroorganismen infiziert sind.

Die Bestimmung, welcher Elicitoren-haltige Mikroorganismus die Enzymaktivitäten oder die Syntheseleistung eines bestimmten Mikroorganismus steigert, erfolgt mittels konventioneller Methoden, die dem Fachmann geläufig sind.

Die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, soweit es die Fermentation mittels Mikroorganismen betrifft, für den Fachmann unproblematisch. Der Mikroorganismus, dessen Enzymaktivität oder dessen Syntheseleistung gesteigert werden soll, wird unter den bekannten Bedingungen angezüchtet; dann setzt man der Kultur die inaktivierten Elicitoren-haltigen Mikroorganismen, Fragmente derselben, Zellextrakte derselben oder Exkretionen derselben zu und setzt die Fermentation wie üblich fort. Die Zugabe der inaktivierten Mikroorganismen, der Fragmente oder Extrakte dieser Organismen oder der Exkretionen von Elicitoren-haltiger Mikroorganismen kann bereits zu Fermentationsbeginn erfolgen. Die optimale Zugabezeit ist naturgemäß von der Art des angezüchteten Mikroorganismus abhängig, insbesondere vom Verlauf seiner exponentiellen Wachstumsphase und muß im Einzelfall ermittelt werden. So erweist es sich bei Bakterien beispielsweise oft als zweckmäßig, diese Zugabe 4 bis 30 Stunden nach Fermentationsbeginn durchzuführen. Bei der Zugabe inaktivierter Mikroorganismen oder Fragmente derselben verwendet man pro Kubikmeter Fermentationsbrühe üblicherweise 1 bis 1000 g (vorzugsweise 10 bis 200 g) inaktivierten Mikroorganismus oder 0,1 bis 100 g (vorzugsweise 1 bis 30 g) des Fragments dieses Organismus. Verwendet man Exkretionen von Elicitoren-haltigen Mikroorga-

nismen so wird es in der Regel ausreichend sein, pro Kubikmeter Fermentationsvolumen 1 bis 50 l der Exkretions-Lösung anzuwenden. Wenn das erfindungsgemäße Verfahren dazu dient, die Enzymaktivität eines Mikroorganismus, der zur enzymatischen Umwandlung von Substraten angewendet wird, zu steigern, wird man die Zugabe des Substrates in der Regel 0 bis 10 Stunden nach erfolgter Zugabe des Elicitoren-haltigen inaktivierten Mikroorganismus oder dessen Fragmenten oder Exkretionen beginnen.

Die optimalen Fermentationsbedingungen sind von der Art des verwendeten Mikroorganismus, dem verwendeten Nährmedium, der Fermentationszeit, der Art und Menge des Elicitoren-haltigen Materials etc. abhängig; sie müssen im Einzelfall durch Vorversuche, wie sie dem Fachmann geläufig sind, ermittelt werden.

Zur Herstellung der inaktivierten Elicitoren-haltigen Mikroorganismen werden diese unter den üblichen Bedingungen angezüchtet, sodann durch Zentrifugieren oder Filtration von der Kulturbrühe getrennt, gewünschtenfalls gewaschen und nochmals isoliert. Zur Inaktivierung der Mikroorganismen können unterschiedliche Verfahren angewendet werden.

Mögliche Inaktivierungsmethoden bestehen darin, auf diese Mikroorganismen typische Zellgifte, wie Ethylenoxide, Formaldehyd, Ozon, Quecksilberverbindungen, organische Lösungsmittel, wie Methanol, Ethanol oder Aceton einwirken zu lassen oder die Mikroorganismen durch Erhitzen auf 90° bis 140° durch Einwirkung extremer Druckdifferenzen (Desintegration), Einwirken hochfrequenter elektrischer Felder oder durch UV-Bestrahlung, Bestrahlen mit  $\gamma$ -Strahlen oder Ultraschalleinwirkung abzutöten. Die Bedingungen, unter denen die Inaktivierung durchgeführt werden kann, sind dem Fachmann wohl bekannt. (K.H. Wallhäuser, H. Schmidt: Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Chemotherapie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (DE), 1967).

Fragmente Elicitoren-haltiger Mikroorganismen kann man beispielsweise durch Lysieren der Mikroorganismen durch Einwirken von osmotischen Schock oder Temperaturschock, durch Autolyse der Mikroorganismen, durch Behandeln der Zellen mit Ultraschall oder durch Zerreissen der Mikroorganismen mit Glasperlen, Glasstaub oder Quarzsand und anschließendem differenzierten Zentrifugieren erhalten (Hughes, D.E., Wimpenny, J.W.T. and Lloyd, D.: The disintegration of micro-organisms. In: Methods in Microbiology, Vol13, (Norris, J. R. and Ribbons, D.W., eds.) pp. 1-54, Academic Press, New York, London, 1971).

Aus diesen Zellfragmenten können beispielsweise durch Trypsin-Behandlung gereinigte Zellwandfraktionen dargestellt werden. Die bereits erwähnten und in den nachfolgenden Ausführungsbeispielen verwendeten Zellwandfraktionen wurden nach dem von Schleifer und Kandler (Arch.Mikrobiol. 57, 1967, 335-365) beschriebenen Verfahren hergestellt.

Andererseits ist es aber auch möglich, aus wasserlöslichen Zellbestandteilen durch Ausfällen, beispielsweise mit Ethanol oder Aceton Elicitoren-haltige Präzipitate herzustellen (Kocourek, J. and Ballou, C.E., J. Bacteriol. 100, 1969, 1175-1181).

Exkretionen Elicitoren-haltiger Mikroorganismen sind aktiv abgegebene, durch Lysieren, "leaky machen", Extraktion mit überkritischen verflüssigten Gasen (z.B. Kohlendioxid) oder Hitzesterilisation von Zellen in Wasser erhaltene Zellbestandteile, wasserlösliche oder durch Abfiltrieren oder Abzentrifugieren der Organismen erhaltene Kulturbrühen. Diese können bei Bedarf weiter aufgereinigt werden, beispielsweise durch Extraktion lipophiler Substanzen, Adsorption stark färbender Substanzen etc.

Es wurde bereits erwähnt, daß die Anwendung von enzymfreien Elicitoren-haltigem Material von Bakterien zur Steigerung der Leistung zur Synthese von Inhaltsstoffen höherer Pflanzen experimentell belegt werden konnte; dies könnte eventuell für die Anwendung pflanzlicher Zellkulturen zur Herstellung von Arzneimittelwirkstoffen von Bedeutung sein (M.H. Zenk in: Pharmazie heute, 103, 1982, Band 3, 131-138). Grundsätzlich scheint es auch denkbar, daß Elicitoren-haltiges Material von Bakterien auch zur Steigerung der Leistung zur Synthese von Inhaltsstoffen in Kulturen tierischer oder menschlicher Gewebe oder Zellen dienen könnte, oder in der Therapie - beispielsweise bei Wundbehandlungen - Anwendung finden könnte.

Die nachfolgenden Ausführungsbeispiele dienen zur näheren Erläuterung der Erfindung.

Beispiel 1

Stimulation der Synthese von gefärbten Inhaltsstoffen (Actinorhodin, Prodiosin) bei *Streptomyces lividans* (ATCC 19844) durch Zellwandpräparate.

80 ml eines Nährmediums bestehend aus

103 g Saccharose  
10 g Glucose  
10,12 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat  
0,25 g Kaliumsulfat  
0,1 g Casaminoacids (Difco Labs, Detroit/USA)  
800 ml destilliertes Wasser

werden sterilisiert (20 Minuten, 120° C) und mit folgenden frisch bereiteten Lösungen steril supplementiert.

1 ml 0,5 Ziger Kaliumdihydrogen-Phosphat-Lösung  
8 ml 3,68 Ziger Calciumchlorid-Dihydrat-Lösung  
1,5 ml 20 Ziger L-Prolin-Lösung  
10 ml 5,73 Ziger TES-Puffer-Lösung (pH 7,2)  
0,2 ml Spurenelementen-Lösung - enthaltend pro Liter  
40 mg Zink(II)-chlorid  
200 mg Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat  
10 mg Kupfer(II)-chlorid-Dihydrat  
10 mg Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat  
10 mg Dinatriumtetraborat-Dihydrat  
10 mg Hexaammonium-heptamolybdat-Tetrahydrat  
0,5 ml 1 N-Natronlauge

Je 1,8 ml dieser Nährlösung werden steril in die 24 jeweils 3 ml fassenden Kammer einer Polystyrol-Multischale (Multidish, Fa. Nunc, 6200 Wiesbaden 12) eingebracht. Je 2 mg der auf Elicitor-Gehalt zu testenden Zellwandpräparate werden in bidestilliertem Wasser 20 Minuten bei 120° C sterilisiert und die erhaltenen Suspensionen den Kammer zugesetzt. 2 Kammer erhalten keine Zusätze, sie dienen als Kontrollen. In allen Kammer wird das Volumen einheitlich mit bidestilliertem Wasser steril auf 2 ml eingestellt. Jede Kammer wird identisch mit 5 µl einer Sporensuspension von *Streptomyces lividans* (ATCC 19844) steril beimpft. Die Inkubation des Versuchsansatzes erfolgt aerob (Tablaschüttler; 100 Umdrehungen pro Minute) bei 26° C.

Nach 96 Stunden zentrifugiert man die Zellen ab, wäscht sie mit physiologischer Kochsalzlösung, trocknet sie im Vakuum über Kalziumchlorid und erhält so die in der Tabelle aufgeführten Zellausbeuten. Die bei der Zentrifugation erhaltenen Überstände werden auf einen pH-Wert von 7 eingestellt, auf 4 ml mit Wasser verdünnt und ihre Absorptionspektren zwischen 180 und 800 nm ermittelt. Die relativen Mengen der synthetisierten gelösten Sekundärstoffe Actinorhodin und Prodigiosin werden näherungswise durch Wiegen der Absorptionsgipfel der automatisch aufgezeichneten Spektren ermittelt.

Die nachfolgende Tabelle 3 zeigt die in dieser Versuchsreihe erzielten Ergebnisse.

TABELLE 3

<u>Getestete Bakterien-</u> <u>zellwände von</u>	<u>Trockenzell-</u> <u>ausbeute (mg)</u>	<u>Farbstoffgehalt</u> <u>rel. Absorptionseinheiten</u>
ohne (Kontrolle)	22	1
B. ammoniagenes (ATCC 6872)	25	38
B. glutamingenes (ATCC 13747)	32	24
Ba. pumilus (ATCC 7061)	34	2
B. linens (ATCC 19391)	23	1
C. diphtheriae (Mass. 8)	24	34
C. melassecola (ATCC 17965)	26	34
C. glutamicum (ATCC 13032)	43	50
C. lilium (ATCC 15990)	33	40
Ce. cellasea (ATCC 14359)	36	2
L. plantarum (DSM 20174)	32	31
S. aureus Stamm H	44	1

B = Brevibacterium

Ba= Bacillus

C = Corynebacterium

Ce= Cellulomonas

L = Lactobacillus

S = Staphylococcus

Beispiel 2

Stimulation der Synthese von gefärbten Inhaltsstoffen (Actinorhodin, Prodigiosin) bei *Streptomyces lividans* (ATCC 19844) durch Zellwandextrakte.

Unter den Bedingungen des Beispiels 1, jedoch unter Verwendung der Sterilfiltrate der in bidestilliertem Wasser 20 Minuten bei 120° C sterilisierten 2 mg Zellwandpräparate wird eine fast gleich starke Stimulation der Farbstoffbildung bei *Streptomyces lividans* (ATCC 19844) erzielt, wie bei der Verwendung von Suspensionen dieser sterilisierten Zellwände.

Beispiel 3

Stimulation der Synthese von gefärbten Inhaltsstoffen (Actinorhödin, Prodigiosin) bei *Streptomyces lividans* (ATCC 19844) durch Zellextrakte.

Unter den Bedingungen des Beispiels 2, jedoch unter Verwendung von je 20 mg Zellmasse anstelle von 2 mg Zellwandpräparat wird eine etwa gleich starke Stimulation der Farbstoffbildung erzielt, wie bei der Verwendung von Suspensionen der sterilisierten Zellwände.

Beispiel 4

Stimulation der Synthese von gefärbten Inhaltsstoffen bei *Streptomyces coelicolor* A3(2) bzw. (ATCC 13 405).

Unter den Bedingungen des Beispiels 1, jedoch unter Verwendung von *Streptomyces coelicolor* A3(2) erzielt man eine deutliche Stimulation der Farbstoffbildung (wahrscheinlich ebenfalls Actinorhodin) bei diesem Bakterium.

Beispiel 5

Stimulation der Synthese von gefärbten Inhaltsstoffen bei *Streptomyces griseoruber* (DSM 40275).

Unter den Bedingungen des Beispiels 1, jedoch unter Verwendung von *Streptomyces griseoruber* (DSM 40275) erzielt man bei diesem Bakterium ebenfalls eine sehr deutliche Steigerung der Farbstoffbildung (vermutlich Anthracyclin-Antibiotika).

Beispiel 6

Stimulation der Synthese gefärbter Inhaltsstoffe bei *Streptomyces purpurascens* (DSM 40 310).

Unter den Bedingungen des Beispiels 1, jedoch unter Verwendung von *Streptomyces purpurascens* (DSM 40 310) erzielt man bei diesem Bakterium ebenfalls eine starke Steigerung der Farbstoffbildung (vermutlich ebenfalls Anthracyclin-Antibiotika).

Beispiel 7

Stimulation der Synthese gefärbter Inhaltsstoffe bei *Streptomyces latericius* (DSM 40 163).

Unter den Bedingungen des beispiels 1, jedoch unter Verwendung von *Streptomyces latericius* (DSM 40 163) erzielt man bei diesem Bakterium ebenfalls eine signifikante Steigerung der Farbstoffbildung.

Beispiel 8

Stimulation der Synthese gefärbter Inhaltsstoffe bei *Streptomyces violaceus* (DSM 40 082).

Unter den Bedingungen des Beispiels 1, jedoch unter Verwendung von *Streptomyces violaceus* (DSM 40 082) erzielt man bei diesem Bakterium ebenfalls eine signifikante Steigerung der Farbstoffbildung.

Beispiel 9

Stimulation der Bildung von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Cephalosporine, Penicillin N) durch *Streptomyces clavuligerus* (ATCC 27064).

5 g 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)

3,5 g Dikaliumhydrogenphosphat

0,6 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat

2 g L-Asparagin

10 g Glycerin

1 g Hefeextrakt (Oxid, Wesel, DE)

1 ml Spurenelementsalz-Lösung - enthaltend pro Liter

1 g Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat

1 g Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat

1 g Zinkchlorid-Heptahydrat

1 g Kalziumchlorid

werden mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt und sterilisiert (20 Minuten; 120°).

Je 1,8 ml dieser Nährösung werden steril in 3 ml fassende Kammern einer sterilen Polystyrol-Multischale (Multidish; Fa. Nunc, 62 Wiesbaden 12) eingebracht. Je 2 mg der auf Elicitor-Aktivität zu testenden Zellwandpräparate oder 10 mg der zu testenden Zellen werden als in bidestilliertem Wasser sterilisierte (20 bzw. 45 Minuten 120° C) homogene Suspensionen zugesetzt. Zwei Kammern, die als Kontrolle dienen, erhalten keine Zusätze. In allen Kammern wird sodann das Volumen einheitlich mit bidestilliertem Wasser steril auf 2 ml eingestellt. Jede Kammer wird identisch mit 5 µl einer Sporensuspension von *Streptomyces clavuligerus* (ATCC 27064) beimpft.

Die Inkubation der Versuchsreihe wird unter aeroben Bedingungen (Tablaschüttler; 150 Umdrehungen pro Minute) bei 26° C vorgenommen. Die Inkubationszeit beträgt 24-48 Stunden.

Die Antibiotikumbildung wird im Vergleich mit den Kontrollen mit Hilfe des Plattendiffusionstests überprüft. Die in Soft-Nähragar suspendierten Detektororganismen sind *Micrococcus luteus* bzw. *Bacillus subtilis* ( $10^6$  Zellen pro ml). Auf Standardfilterplättchen (0,9 cm Durchmesser) werden jeweils 25 µl zentrifugierte ( $48.000 \times g$ ) Kulturbrühe aus den Testkammern appliziert. Nach einer Diffusionszeit von 4 Stunden bei 4° C wird der Biertest für 24 Stunden bei 30° C inkubiert.

Bei den Kulturen, die unter Zusatz abgetöteter Zellen von *Brevibacterium flavum* ATCC 13826, oder von Zellwandpräparationen dieses Bakteriums beziehungsweise von Zellwandpräparationen von *Corynebacterium diphtheriae* (Stamm Mass. 8) angezüchtet wurden, zeigten eindeutig vergrößerte Hemmhöfe im Vergleich zu den Kontrollen eine vermehrte Bildung von  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Penicillin N, Cephalosporine) durch *Streptomyces clavuligerus* an.

Beispiel 10

Stimulation der Bildung von Alkaloiden (Sanguinarin, Chelirubin, Marcarpin und Chelerythrin) durch Kulturen von *Eschscholtzia californica*.

In 24 1 ml Kammern einer Polystrol-Multischale (Fa. Nunc, 6200 Wiesbaden 12) werden unter den von J. Berlin et. al. (Z. Naturforsch., 38c, 1983, 346-352) als optimal beschriebenen Bedingungen jeweils Gewebekulturen von *Eschscholtzia californica* angezüchtet. Eine der Kammern bleibt ohne weiteren Zusatz als Kontrolle, eine Kammer erhält 266 mg/l hitzeextrahierten und ethanolgefällten Hefefelicitor (hergestellt nach Kocourek J. and Ballou, C.E., J. Bacteriol 100, 1969, 1175-1181), die übrigen je 266 mg/l Zellwandpräparat der Bakterien, die in Tabelle 3 aufgeführt sind. Dann werden die Kulturen 72 Stunden lang bei 24°C inkubiert und anschließend der Alkaloidgehalt der Kulturen photometrisch ermittelt, wobei der durch den Hefefelicitor induzierte Alkaloidgehalt als 100 % gewertet wird.

Die nachfolgende Tabelle 4 zeigt die in dieser Versuchsreihe erzielten Ergebnisse.

TABELLE 4

<u>Getestete Bakterien-</u> <u>zellwände</u>	<u>% Elicitoraktivität</u>
<i>Brevibacterium butanicum</i> ATCC 21196	19
<i>Brevibacterium flavum</i> ATCC 13826	16
<i>Brevibacterium flavum</i> ATCC 14057	30
<i>Brevibacterium glutamingenes</i> ATCC 137	113
<i>Brevibacterium lactofermentum</i> ATCC 13655	43
<i>Brevibacterium ammoniagenes</i> ATCC 6872	40
<i>Corynebacterium hydrocarboclastum</i> ATCC 15592	8
<i>Corynebacterium nephridii</i> ATCC 11425	123
<i>Corynebacterium paurometabolum</i> ATCC 8368	16
<i>Corynebacterium lilium</i> ATCC 15990	108
<i>Corynebacterium striatum</i> ATCC 6940	17
<i>Corynebacterium petrophilum</i> ATCC 19080	0
<i>Corynebacterium xerosis</i> ATCC 373	102
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> Stamm Mass. 8	137
<i>Rhodococcus fasciens</i> ATCC 12975	27
<i>Rhodococcus fascians</i> 1	11
<u>Isolat von Prof. Dr. Stolp, Univ. Bayreuth</u>	
<i>Rhodococcus fascians</i> 2	7
<u>Isolat von Prof. Dr. Stolp, Univ. Bayreuth</u>	

Beispiel 11

Stimulierung der Bildung von Indolalkaloiden (Vallesiacotamin) in Kulturen von *Rauvolfia serpentina*.

Die Suspensionskultur von *Rauvolfia serpentina* (Stöckigt, J., A. Pfitzner and J. Firl: Plant Cell Rep. 1, 36-39 (1981) wird in Linsmaier und Skoog (LS)-Medium (Physiol. Plantarum 18, 100-127 (1965) auf Rotationsschüttlern (100 Umdrehungen pro Minute) bei 23° C und Dauerlicht (600 Lux) kultiviert. Zur Elicitierung werden 200 g Zellfrischgewicht/l LS-Medium angeimpft. Als Elicitoren-haltige Fragmente von Mikroorganismen werden Zellwandpräparate der in der Tabelle 4 aufgeführten Bakterien in einer Konzentration von 130 mg/l Medium verwendet.

Nach einer Inkubation von 5 Tagen hat sich sowohl in den elicitierten Kulturen als auch in den Kontrollen die Zellmasse verdoppelt. Die Zellen werden geerntet und mit Methanol extrahiert.

Die Menge des Indolalkaloids Vallesiacotamin wird über eine HPLC-Auf trennung der Extrakte bestimmt. Während die unbehandelten Kontrollkulturen nur 1,16 mg/l Medium enthalten, beträgt die Ausbeute bei den elicitierten Kulturen maximal 58 mg/l. Dies entspricht einer Steigerung um das 50-fache durch den Elicitor.

Beispiel 12

Stimulierung der 17-Ketosteroid-Reduktase-Aktivität von *Rhodotorula glutinis* IFO 0389.

a) Ein 2 l Erlenmeyerkolben mit 500 ml steriles Nährmedium enthaltend  
5 % Glucose-Monohydrat  
2 % Cornsteep liquor  
- eingestellt auf pH 6,5 -  
wird mit einem Abstrich aus einer Schrägagarkultur von *Rhodotorula glutinis* IFO 0389 beimpft und 40 Stunden lang bei 30° C mit 190 Umdrehungen pro Minute angezüchtet.

b) Ein 500 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml sterilen Nährmediums enthaltend  
1 % Cornsteep liquor  
5 % Nurupan<sup>(R)</sup> (Hersteller Nurupan GmbH, 4000 Düsseldorf 1; DE)  
1 % Metarin<sup>(R)</sup> (Hersteller Lucas Meyer; 2000-Hamburg 28; DE)  
- eingestellt auf pH 6,2 -  
wird mit 10 ml der gemäß Beispiel 12a hergestellten Rhodotorula-Vorkultur  
beimpft und 7 Stunden lang bei 30° C und 180 Umdrehungen pro Minute  
angezüchtet.

Danach setzt man der Kultur 10 mg 3-Hydroxy-1,3,5(10),7-estratetraen-17-on  
zu und fermentiert weitere 210 Stunden lang. Dann extrahiert man die Kultur  
mit Methylisobutylketon, engt den Extrakt ein und reinigt das erhaltene  
Rohprodukt durch Chromatographie über eine Kieselgelsäule. Man erhält so  
5,9 mg 1,3,5(10),7-Estratetraen-3,17 $\alpha$ -diol = 59 % der Theorie.

c) Unter den Bedingungen des Beispiels 12b werden 10 mg 3-Hydroxy-1,3,5(10),7-  
estratetraen-17-on mit einer Kultur von Rhodotorula glutinis fermentiert,  
jedoch mit dem Unterschied, daß man dieser Kultur unmittelbar vor der  
Substratzugabe 5 ml einer sterilen Suspension von 50 mg einer Zellwandprä-  
paration von *Bacillus licheniformis* (ATCC 9945) in Wasser zusetzt. Nach Auf-  
arbeitung der Kultur erhält man 6,8 mg 1,3,5(10),7-Estratetraen-3,17-diol =  
68 % der Theorie.

Beispiel 13

Stimulierung der Steroid- $\Delta^1$ -Dehydrase-Aktivität von *Bacillus lentus*  
(ATCC 13805).

a) Ein 2 l Erlenmeyerkolben mit 500 ml steriler Nährösung enthaltend  
0,5 % Cornsteep liquor  
0,05 % Glucose-Monohydrat  
0,1 % Hefeextrakt  
- eingestellt auf pH 7,0 -  
wird mit einer Abschwemmung von *Bacillus lentus* (ATCC 13 805) beimpft und 48 Stunden lang bei 30° C mit 190 Umdrehungen pro Minute geschüttelt.

b) Ein 500 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml steriler Nährösung enthaltend  
3,0 % Sojapuder  
0,5 % Cornsteep liquor  
0,1 % Hefeextrakt  
0,05 % Glucose-Monohydrat  
- eingestellt auf pH 7,3 -  
wird mit 10 ml der *Bacillus lentus* Vorkultur beimpft und 7 Stunden lang bei 30° C mit 180 Umdrehungen pro Minute geschüttelt. Dann setzt man der Kultur eine sterilfiltrierte Lösung von 40 mg 6α,9α-Difluor-11β,17α-dihydroxy-16α-methyl-4-pregnien-3,20-dion in 4 ml Dimethylformamid zu und inkubiert weitere 41 Stunden lang.

Dann extrahiert man die Kultur mit Methylisobutylketon, engt den Extrakt im Vakuum ein und reinigt den Rückstand durch Chromatographie über eine Kieselgelsäule. Man erhält so 16 mg 6α,9α-Difluor-11β,17α-dihydroxy-16α-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion (= 40 % der Theorie).

c) Unter den Bedingungen des Beispiels 13b werden 40 mg 6α,9α-Difluor-11β,17α-dihydroxy-16α-methyl-4-pregnien-3,20-dion mit einer Kultur von *Bacillus lentus* fermentiert, jedoch mit dem Unterschied, daß man dieser Kultur unmittelbar vor der Substratzugabe 5 ml einer sterilen Suspension von 50 mg Zellwandpräparation von *Corynebacterium diphtheriae* (Stamm Mass. 8) in Wasser zusetzt. Nach Aufarbeitung der Kultur erhält man 21 mg 6α,9α-Difluor-11β,17α-dihydroxy-16α-methyl-1,4-pregnadien-3,20-dion (= 52,5 % der Theorie).

Beispiel 14

Stimulierung der Bildung von Alkaloiden (Lysergsäureamid und Isolysergsäureamid) von *Claviceps paspali* (ATCC 13895).

a) Ein 500 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml einer sterilen Nährlösung enthaltend

- 4 % Sorbit (technisch rein)
- 1 % Glucose-Monohydrat
- 2 % Bernsteinsäure
- 0,6 % Ammoniumsulfat
- 0,5 % Hefeextrakt (Difco<sup>(R)</sup> der Difco Labs. Detroit/USA)
- 0,1 % Kaliumdihydrogenphosphat,
- 0,03% Magnesiumsulfat-Heptahydrat
- eingestellt mit Natronlauge auf pH 5,2 -

wird mit einer auf -70° C tiefgefrorenen Kultur von *Claviceps paspali* (ATCC 13895) beimpft und 5 Tage lang bei 24° C und 240 Umdrehungen pro Minute geschüttelt.

b) Ein 500 ml Erlenmeyerkolben mit 50 ml einer sterilen Nährlösung enthaltend

- 8 % Sorbit (technisch rein)
- 6 % Bernsteinsäure
- 0,9 % Ammoniumsulfat
- 0,1 % Calciumnitrat-Tetrahydrat
- 0,05 % Dikaliumhydrogenphosphat
- 0,03 % Magnesiumsulfat-Heptahydrat
- 0,02 % Hefeextrakt (Difco<sup>(R)</sup> der Difco Labs., Detroit/USA)
- 0,0007 % Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat
- 0,0006 % Zinksulfat-Heptahydrat

- eingestellt mit Natronlauge auf pH 5,2 -

wird mit 5 ml Vorkultur von *Claviceps paspali* beimpft und 250 Stunden lang bei 24° C mit 240 Umdrehungen pro Minute geschüttelt.

Dann setzt man der Kultur soviel Natronlauge zu, daß ein pH-Wert von mindestens 10 erreicht ist, extrahiert mit Methylisobutylketon, engt die Extrakte im Vakuum ein und reinigt sie durch Chromatographie über eine Kieselgelsäule.

Man erhält so 35 mg eines Gemisches aus Lysergsäureamid und Isolysergsäureamid (Ausbeute 700 mg/l Kultur).

c) Unter den Bedingungen der Beispiele 14b, wird eine Kultur von *Claviceps paspali* angezüchtet, jedoch mit dem Unterschied, daß man der Kultur nach 72 Stunden 5 ml einer sterilen Suspension von 25 mg Zellwandpräparation von *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* (ATCC 7469) in Wasser zusetzt. Nach Aufarbeitung der Kultur erhält man 45 mg eines Gemisches aus Lysergsäureamid und Isolysergsäureamid (Ausbeute 900 mg/l Kultur).

#### Beispiel 16

Stimulierung der 15 $\alpha$ -Hydroxylase-Aktivität von *Penicillium raistrickii* (ATCC 10490).

a) Ein 2 l-Erlenmeyerkolben mit 500 ml sterilem Nährmedium enthaltend

3	% Glucose-Monohydrat
1	% Cornsteep liquor
0,2	% Natriumnitrat
0,05	% Magnesiumsulfat-Heptahydrat
0,05	% Kaliumchlorid
0,002	% Eisen(II)-sulfat-Hexahydrat
0,1	% Kaliumdihydrogenphosphat
0,2	% Dikaliumhydrogenphosphat

-eingestellt auf pH 6,0-

wird mit einem Abstrich aus einer Schrägagarkultur von *Penicillium raistrickii* (ATCC 10490) beimpft und 48 Stunden lang bei 30° C mit 180 Umdrehungen pro Minute angezüchtet.

b) Ein 500 ml-Erlenmeyerkolben mit 100 ml steriles Nährmedium enthaltend

1 % Cornsteep liquor  
3 % Glucose-Monohydrat  
0,1 % Kaliumdihydrogenphosphat  
0,2 % Dikaliumhydrogenphosphat  
0,05 % Magnesiumsulfat-Heptahydrat

-eingestellt auf pH 6,0-

wird mit 10 ml der gemäß a) hergestellten *Penicillium*-Vorkultur beimpft.

Danach setzt man der Kultur 300 mg 13-Ethyl-4-gonen-3,17-dion zu und fermentiert 120 Stunden bei 30° C mit 180 Umdrehungen pro Minute.

Dann extrahiert man die Kultur mit Methylisobutylketon, engt den Extrakt ein und reinigt das erhaltene Rohprodukt durch Chromatographie über eine Kieselgelsäule. Man erhält so 180 mg 13-Ethyl-15 $\alpha$ -hydroxy-4-gonen-3,17-dion.

c) Unter den Bedingungen von b) werden 300 mg 13-Ethyl-4-gonen-3,17-dion mit einer Kultur von *Penicillium raistrickii* fermentiert, jedoch mit dem Unterschied, daß man dieser Kultur unmittelbar vor der Substratzugabe 5 ml einer sterilen Suspension zugibt, die 50 mg einer Zellwandpräparation von *Corynebacterium diphtheriae* (Stamm Mass. 8) in Wasser enthält. Nach Aufarbeitung der Kultur erhält man 210 mg 13-Ethyl-15 $\alpha$ -hydroxy-4-gonen-3,17-dion.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Steigerung von Enzym-Aktivitäten und der Syntheseleistung von Organismen, dadurch gekennzeichnet, daß man dieselben mit inaktivierten Elicitoren-haltigen Mikroorganismen, Fragmenten derselben oder Exkretionen Elicitoren-haltiger Mikroorganismen in Kontakt bringt, mit der Maßgabe, daß man zur Steigerung von Enzym-Aktivitäten und der Syntheseleistung nichtmikrobieller Organismen inaktivierte Elicitoren-haltige Bakterien, Fragmente derselben oder Exkretionen Elicitoren-haltiger Bakterien verwendet.
2. Verfahren zur Steigerung von Enzym-Aktivitäten und der Syntheseleistung von Mikroorganismen gemäß Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man dieselben mit inaktivierten Elicitoren-haltigen Mikroorganismen, Fragmenten derselben oder Exkretionen Elicitoren-haltiger Mikroorganismen in Kontakt bringt.
3. Verfahren zur Steigerung der Syntheseleistung von Mikroorganismen gemäß Patentanspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Farbstoffbildung, zur Alkaloidbildung oder zur Antibiotikabildung befähigte Bakterien, Pilze und Hefen mit inaktivierten Elicitoren-haltigen Bakterien, Pilzen oder Hefen, Fragmenten derselben oder Exkretionen dieser Mikroorganismen in Kontakt bringt.
4. Verfahren zur Steigerung von Enzym-Aktivitäten von Mikroorganismen gemäß Patentanspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Steroidtransformation befähigte Bakterien, Pilze oder Hefen mit inaktivierten Elicitoren-haltigen Bakterien, Pilzen oder Hefen, Fragmenten derselben oder Exkretionen dieser Mikroorganismen in Kontakt bringt.
5. Verfahren zur Steigerung der Syntheseleistung von Organismen gemäß Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man Zellkulturen von zur Farbstoffsynthese, zur Alkaloidsynthese oder zur Phytoalexinsynthese befähigten höheren Pflanzen mit inaktivierten Elicitoren-haltigen Bakterien, Fragmenten derselben oder Exkretionen dieser Bakterien in Kontakt bringt.

6. Verfahren zur Steigerung von Enzym-Aktivitäten und der Syntheseleistung von Organismen gemäß Patentanspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man dieselben mit in Wasser hitzesterilisierten Elicitoren-haltiger Mikroorganismen, oder mit Filtraten derselben in Kontakt bringt.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/EP 89/00015

## I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) \*

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC C 12 N 9/00;  
 Int. Cl. <sup>4</sup> C 12 N 1/38; C 12 N 1/00; C 12 N 5/00

## II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ?

Classification System	Classification Symbols
Int. Cl. <sup>4</sup>	C 12 N

Documentation Searched other than Minimum Documentation  
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched \*

## III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT \*

Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
X	Insect Biochem., volume 16, Nr. 3, 1986, Oxford (GB) H. Yoshida et al.: "Microbial activation of two serine enzymes and prophenoloxidase in the plasma fraction of hemolymph of the silkworm, Bombyx Mori", pages 539-545, see abstract; page 544, column 1, line 59 - column 2, line 12 --	1,6
X	Chemical Abstracts, volume 99, Nr. 5, 1983 (Columbus, Ohio, US) W.F. Fett et al.: "Bacterial growth and phytoalexin elicitation in soybean cell suspension cultures inoculated with Pseudomonas syringae pathovars", see page 325, abstract 36088t & Physiol. Plant Pathol. 1983, 22(2), 151-72 --	1,5

\* Special categories of cited documents: <sup>10</sup>

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the International filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

## IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report
12 April 1989 (12.04.89)	17 May 1989 (17.05.89)
International Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category*	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
P,X	Biological Abstracts, volume 86, 1988 Philadelphia (US), K. Novak et al.: "Elicitor activity of Agrobacterium radiobacter in plants" see abstract 118095 & Folia Microbiol. 33(4): 261-66 --	1,5
A	EP, A, 0226354 (CANADIAN PATENTS AND DEVELOPMENT LTD) 24 June 1987, see claims --	1-6
A	Plant Cell Reports, volume 6, 1987 Berlin (DE) H.M. Schumacher et al.: "Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in Eschscholtzia cell cultures", pages 410-413 see the whole article -----	1-6

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.

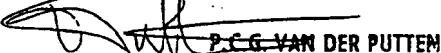
EP 8900015  
SA 26378

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 12/05/89. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0226354	24-06-87	JP-A- 62208292	12-09-87

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 89/00015

<b>I. KLASSEKIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup>		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int Cl <sup>4</sup> C 12 N 9/00; C 12 N 1/38; C 12 N 1/00; C 12 N 5/00		
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBiete</b>		
Recherchierte Mindestprüfstoff <sup>7</sup>		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int. Cl. <sup>4</sup>	C 12 N	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>		
<b>III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>9</sup></b>		
Art <sup>*</sup>	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
X	<p>Insect Biochem., Band 16, Nr. 3, 1986, Oxford (GB)</p> <p>H. Yoshida et al.: "Microbial activation of two serine enzymes and prophenoloxidase in the plasma fraction of hemolymph of the silkworm, Bombyx Mori", Seiten 539-545</p> <p>siehe Zusammenfassung; Seite 544, Spalte 1, Zeile 59 - Spalte 2, Zeile 12</p> <p>---</p>	1,6
X	<p>Chemical Abstracts, Band 99, Nr. 5, 1983 (Columbus, Ohio, US)</p> <p>W.F. Fett et al.: "Bacterial growth and phytoalexin elicitation in soybean cell suspension cultures inoculated with Pseudomonas syringae pathovars", siehe Seite 325, Zusammenfassung 36088t &amp; Physiol. Plant Pathol. 1983, 22(2), 151-72</p> <p>---</p>	1,5
. / .		
<p><sup>*</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p>		<p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b>		
Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
12. April 1989	17 MAY 1989	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten	
Europäisches Patentamt	 P.C.G. VAN DER PUTTEN	

## III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsatzung von Blatt 2)

Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	Biological Abstracts, Band 86, 1988 Philadelphia (US) K. Novak et al.: "Elicitor activity of Agrobacterium radiobacter in plants" siehe Zusammenfassung 118095 & Folia Microbiol. 33(4): 261-66 --	1,5
A	EP, A, 0226354 (CANADIAN PATENTS AND DEVELOPMENT LTD) 24. Juni 1987, siehe Patentansprüche --	1-6
A	Plant Cell Reports, Band 6, 1987 Berlin (DE) H.M. Schumacher et al.: "Elicitation of benzophenanthridine alkaloid synthesis in Eschscholtzia cell cultures", Seiten 410-413 siehe den ganzen Artikel	1-6

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT  
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 8900015  
SA 26378

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 12/05/89

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0226354	24-06-87	JP-A- 62208292	12-09-87

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82